

mRNA 差异显示技术研究进展^{*}

刘荣梅¹, 李凤兰¹, 王淑菊², 胡宝忠¹

(1. 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030; 2. 沈阳化工学院, 沈阳 110142)

摘要: 运用 mRNA 差异显示技术可以了解不同细胞或同类细胞在不同发育阶段、不同生理状态下的基因表达状况, 为研究生命活动过程提供重要信息。对差异显示技术的基本原理、优缺点以及近年来此方法的改进进行了论述和评价, 并对其应用前景进行了简单分析。

关键词: mRNA 差异显示; 银染; 反向 northern; 降低假阳性

中图分类号: S 813 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2007)01-0086-04

Progress in mRNA Differential Display

LIU Rong mei¹, LI Feng lan¹, WANG Shu ju², Hu Bao zhong¹

(1. Life Science College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 2. Shenyang Chemical Technology Institute, Shenyang 110142)

Abstract: mRNA Differential Display could realize gene display status of different developing phase and its physiological state in different and the same cells, which could provide important communication for studying life activity. This paper discussed basic principle, Merits and Demerits, and technique amelioration of mRNA Differential Display in recent years, then analyzed its applications and prospects.

Key words: mRNA Differential Display; silver staining; Reverse Northern Blot; reduce false positive

真核生物基因组中, 仅约 10%~15% 的基因在细胞中表达, 而且不同发育阶段、不同生理状态和不同类型的细胞中表达的基因也不尽相同。基因的差异性表达不仅是细胞形态和功能多样性的根本原因, 而且也是各种生理及病变过程的物质基础, 因此分离、鉴定差异表达的基因具有重要的意义。美国哈佛医学院的两名科学家 Liang P 和 Pardee A D 1992 年根据高等生物成熟的 mRNA 都带有 poly (A) 的特性创立了 mRNA 差异显示技术^[1]。Erric Haay 等 1994 年将这种方法正式命名为差异显示反转录聚合酶链式反应(mRNA Differential Display PCR), 简称 DDRT-PCR。应用这一技术, 科研工作者们在医学、动物、植物、昆虫以及菌类等科研领域进行了更多的研究和探索。目前差异显示技术已成为分离差异表达基因的常规技术, 在基因克隆、基因功能研究、生理代谢机理、抗性机理等方面取得了一定的成绩。

1 DDRT-PCR 技术的原理

DDRT-PCR 技术是在逆转录反应、PCR 反应和聚丙烯酰胺凝胶电泳这三项技术的基础上发展起来的。它利用了大多数真核生物成熟 mRNA 的 3' 端有多聚腺嘌呤序列, 即 poly (A) 尾巴, 因此用 3' 端含有 poly (T) 的引物锚定于来自两组或多组样品的 mRNA poly (A) 尾上, 反转录成 cDNA。用不同组合的锚定引物, 可以将 mRNA 反转录形成若干个亚群的 cDNA。以这些 cDNA 为模板, 利用锚定引物及 5' 端随机引物组成的引物对进行扩增, 理论上可以获得所有 mRNA 的特异扩增片段。将扩增产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳可以有效筛选、分离到差异表达的 cDNA 片段, 对获得表达差异的基因片段进行回收、克隆、鉴定及分析。

2 DDRT-PCR 技术优缺点

2.1 优越性

^{*} 收稿日期: 2006-09-15

第一作者简介: 刘荣梅(1975-), 女, 黑龙江人, 在读博士, 从事植物分子生物学研究。E-mail: lrm1975@sina.com。

通讯作者: 胡宝忠

mRNA 差异显示技术的优点在于效率高,可以同时比较、分析多个来源不同的样品;能用于特定时期表达的基因,而不仅仅是某一细胞系所特有的基因;操作简便、快速,技术上仅仅依靠 RT-PCR 和 DNA 测序胶电泳,简化了试验操作并使鉴定低丰度的 mRNA 成为可能;重现性好,约 90%~95% 的条带都能重现;灵敏性高,仅需 0.2 μ g 总 RNA 作为起始材料,可检出低丰度 mRNA;最突出的优点是不用等到试验结束即判断其是否成功,每一步的结果都可以检验比较。

2.2 缺陷

DDRT-PCR 技术在实际操作中还存在以下不足。(1) 所得的 cDNA 差异片段较短,很少扩增到 ORF(openreading frame)内。由于反转录是靠近 poly(A) 尾巴的 mRNA 序列,且受 DNA 测序胶的限制,只能分辨小于 500 bp 左右的 cDNA 片段,大多是位于 mRNA 3'端约 300 bp 的非翻译区(untranslated regions, 3'UTR),往往不能检测到上游表达的基因信息,对差异片段测序后并不能进行有效的功能预测与分析。(2) 应用敏感度高的 PCR 技术对高丰度 mRNA 起到了放大作用。研究表明,不管用多少个 10 mer 引物,标准的差显技术并不能有效显示细胞中的大量 mRNA^[2],可能会遗漏掉低转录水平的差异 cDNA 片段。(3) 按照 Liang Peng 设计的引物,应该扩增 poly(A)尾上游的部分编码区和非编码区基因片段。但实际上经常会发现,扩增产物的两端都用了随机引物,而没有利用 3'端锚定引物³。cDNA 扩增产物的量不仅取决于 mRNA 的丰度,而且也取决于引物与其相匹配的程度。(4) 假阳性率高,假阳性比例有时高达 50%~75%。由于某些序列的特异性,一些差异表达的转录不能得到分离^[4]。限于聚丙烯酰胺凝胶电泳的分辨力,在变性聚丙烯酰胺凝胶上确定为单一条带的差异片段,有可能是由碱基大小相同、序列略有不同的 cDNA 片段在电泳时发生共迁移而形成,其中某些片段可能来自于差异表达的基因,另一些则可能来自于组成型表达的基因,因此直接将这样的差异片段用作探针进行 Northern 杂交时往往会出现涂布状,从而影响真正差异表达的目的基因的检测。

3 DDRT-PCR 技术的发展

基于上述差异显示技术种种不足,研究者们对试验方法进行了探索和改进。我们认为对于不同的试验材料要建立相应的试验体系。柳淑芳等采用正

交法优化 DDRT-PCR 反应条件,充分考虑到模板浓度、锚定引物浓度、随机引物浓度、dNTPs 浓度、镁离子浓度以及 Taq 酶用量等因素在差异显示反应过程中的交互作用,一次 PCR 反应确定最佳反应组合。将筛选出的条件用于 DDRT-PCR,得到差显结果假阳性率低,重复性和稳定性好,而且简化了反应条件的优选程序^[5]。

3.1 反转录模板

Zimmermann 等 1994 年用总 RNA 作为反转录的模板,其结果与用纯 mRNA 作为模板的差异显示结果相一致^[6]。Hadman 等 1995 年研究表明以总 RNA 为模板会出现大量 5'端引物间的扩增产物,以纯 mRNA 作为反转录模板可减少背景,对以后的操作有利⁷。但是提纯 mRNA 的操作步骤繁琐,回收率不高且常会引入 oligo(dT)污染而使产物模糊不清。Sompayrac(1995)主张用细胞质 RNA 代替总 RNA 以消除核 RNA 的污染,特别是 hnRNA 的污染,可得到较好的试验结果^[8]。

无论使用哪一种模板,都需要高纯度的 RNA。提取 RNA 的方法很多,如 TRIzol 法、CTAB 法、异硫氰酸胍法等,通常都用无 RNAse 活性的 DNase 去除痕量基因组 DNA。

3.2 引物的改进

Liang 等(1992)设计了第 1 代引物的 3'端为 12 种锚定引物 T12MN, 5'端为 20 种 10 mer 引物,共有 240 种组合。两年后又设计了第 2 代引物改两个碱基为一个碱基固定的 3'端引物,即 T12A、T12G 和 T12C,且在引物的 5'端各引入了一个 Hind III 酶切位点,共 60 种组合。单碱基引物的应用,降低了所需逆转录反应的次数,并可减少应用双碱基引物进行逆转录时一部分 mRNA 信息的丢失,在引物末端加入 Hind III 酶切位点,便于后续克隆。第 3 代引物于 1996 年设计,GenHunter 公司 3'端锚定引物和 5'端随机引物都带上 Hind III 酶切位点,引物条数分别减为 3 条和 8 条,而碱基数分别增加至 18 个和 13 个,这样经计算机同源性分析表明所得到的 24 个组合同样能覆盖所有 mRNA,使操作和后续处理更简便、快捷。

从 Khu shbeer 等^[9]、Mou 等^[10]和 Chapman 等^[11]的研究结果来看,在锚定引物中,有 1 个或 2 个 G,其扩增效率比 C 和 A 高。

王刚石等^[12]通过选取与逆转录引物序列相同的带荧光物质标记的双碱基锚定引物 TMR-T7(

dT12) AP, 极大减小了每一锚定引物产生的第一条 cDNA 链的数量, 更可降低 DD 产物的复杂性, 使差异条带在序列胶上易于分辨, 从而使传统方法中常见的“重叠带”现象减少。

3.3 酶的使用

不同的 DNA 聚合酶也可造成 cDNA 扩增类型的差异。Hang 等认为 Perkin - Kimer 生产的 Ampli TaqDNA 聚合酶是进行差异显示最好的 DNA 聚合酶。

3.4 降低 dNTP 浓度

在反应中, 如果 dNTP 浓度过高, 会降低扩增的特异性。研究表明, 将 dNTP 的终浓度降低到 2 $\mu\text{mol/L}$ 在保证产物产量和特异性的前提下, 能最大限度提高序列胶的分辨率。

3.5 选择最适的反转录退火温度

采用较低的反转录温度有利于引物和模板的配对, 但是不利于模板二级结构的解开, 造成合成的 cDNA 第一链偏短。研究者在试验中进行改进, 先在 42 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 30 min, 再在 48 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 30 min, 采用这种方法有利于解开模板的二级结构, 合成长度较长的 cDNA。

3.6 PCR 程序参数的改进

PCR 扩增时的退火温度是决定 PCR 扩增特异性的关键因素之一。最适温度通常为 37 $^{\circ}\text{C}$ ~ 48 $^{\circ}\text{C}$, Liang 等 1992 年开始提供的 PCR 参数为 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、42 $^{\circ}\text{C}$ 1 min、72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。Marten 等人 1995 年利用长引物, 开始为低严谨, 然后采用高严谨, 我们称该方法为增强的差异显示 PCR。1996 年, Clontech 公司采用开始 3 个低严谨循环, 随后的 22 ~ 25 个为高严谨的循环。经这样的改进, 不仅保持差异带的特征性, 而且还显著地增强了重复性和敏感性, 降低了背景, 能扩增长而准确的产物, 这种方法称为长距离差异显示 PCR。

3.7 产物展示

差异条带需要在测序胶上显示, 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳时常发现多数带成簇出现, 其原因可能是同一 cDNA 片段的互补带或 3' 末端 A 造成的泳动速度差异引起的。Bauer 等(1993)初次将非变性凝胶电泳用在差显技术上, 依据是大多数双链 DNA 在非变性聚丙烯酰胺凝胶中的迁移速率大略与其大小的 log 对数值成反比, 但迁移率也受其碱基组成和序列的影响, 以致大小完全相同的 DNA 其迁移率可相差达 10%, 此方法降低了显示谱带的复杂

性, 同时简化了后期进行克隆筛选的工作。

Lohman 等(1995)建立了银染差异显示方法, 核酸银染方法是一种高灵敏度检测核酸变化的方法, 其灵敏度可以检测 pg 水平核酸的变化, 与同位素放射自显影方法具有相似的灵敏性。采用银染显示法不仅快速简便(从 RNA 提取到差异条带回收仅需 2 ~ 3 d), 而且假阳性率很低。显色温度 4 ~ 12 $^{\circ}\text{C}$ 时, 显示出清晰条带。

4 降低假阳性

DDRT - PCR 技术假阳性率(false positive) 高是其致命弱点, 研究者一直在不断进行着优化和改进。试验中可从以下几个方面入手降低假阳性率: ①避免基因组 DNA 的污染; ②严格回收稳定出现的差异条带, 再将回收的二次扩增产物与首次 PCR 产物进行比较, 以进一步证实扩增的特异性; ③严格把握试验材料, 所采用试验材料间的遗传背景差异越小, 假阳性越低, 分离的基因片段与性状间的相关性越强^[13]; ④为了排除假阳性的干扰, 采用反向 RNA 斑点杂交来验证非常有效。反向 Northern 是 Zhang H 等^[14]在 1996 年首次提出的, 该方法是将获得的差异片段结合到尼龙膜上, 分别用对照和处理材料的 RNA 进行反转录标记, 制备成探针。反向 Northern 印迹杂交可以在一次试验中将全部待测的片段进行检测, 而 Northern 印迹杂交很困难; 对于那些短的或无意义的片段反向 Northern 印迹杂交可以一次去除, 而用 Northern 印迹杂交方法一次试验很难区分, 须经几次重复试验才能判断; 此外, 反向 Northern 印迹杂交是一种比较节省、快速的方法^[15]。但是试验中还需注意在挑选差异片段时, 应尽量避免那些较短的片段, 同时必须保证反转录酶有足够的活力, 必要时进行重复试验验证。

5 全长 cDNA 的克隆

由 mRNA 差异显示 PCR 技术获得的 cDNA 片段一般长为 300 ~ 500 bp, 而且大多数都位于 3' 端非翻译区, 这些序列常不能真正代表差异表达的基因, 因而必需克隆全长 cDNA。①传统的 cDNA 文库筛选必需有高质量的 cDNA 文库, 而且费时, 适合于少量基因的研究; ②cDNA 末端快速扩增(RACE)。近几年来, RACE 的成功应用充分显示了它是一种快速、有效地克隆全长 cDNA 的手段, 特别是从微量 mRNA 和低丰度转录本中克隆全长 cDNA; ③利用生物信息学, 使用公共数据库中的资

料进行 EST 查找, 构建重叠群并拼接, 但是所得结果需要进一步试验证实, 如 Northern 杂交或 RT - PCR, 这样可以防止假阳性, 选出真正的阳性差异序列。

6 小结

自 DDRT - PCR 技术创立以来, 人们在技术的发展与应用等方面进行了深入的研究和探索, 极大地提高了该技术的分辨率和有效性, 广泛应用于生物医学^[16, 17]、动植物遗传育种^[18, 19]以及动物营养^[20]等领域。相信此项技术必然促进差异表达基因的鉴别、分离、克隆及其分子机理等的研究。

参考文献:

[1] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of polymerase chainreaction [J] . Science, 1992, 257 (14): 967 971.

[2] Bertoli DJ, Schlichter U H, Adams M J, et al. An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNA[J] . Nucleic Acids Research, 1995, 23 (21): 4520 4523.

[3] Liang P, Zhu W, Zhang X, et al. Differential display using one base anchored oligo dT primers[J] . Nucleic Acids Res, 1994, 22: 5763 5764.

[4] Ghosh S A. Novel ligation mediated PCR based strategy for construction of subtraction libraries from limiting amounts of mRNA [J] . Nucleic Acids Research, 1996, 24 (4): 795 796.

[5] 柳淑芳, 杜立新, 朱靖, 等. 正交法整体优化差异显示反应体系 [J] . 遗传, 2004, 26 (6): 836 840.

[6] Zimmermann J W, and Schultz R M. Analysis of gene expression in the preimplantation mouse embryo: use of mRNA differential display[J] . Proc. Natl. Acad. Sci., 1994, 91: 5456 5460.

[7] Hadman M, Adan B L, Wright G L, et al. Modifications to the differential display technique reduce background and increase sensitivity, Anal[J] . Biochem, 1995, 226(2): 383 386.

[8] Sompayrac L, Jane S, Burn T, et al. Overcoming limitations of the mRNA differential display technique[J] . Nucleic Acids Res, 1995, 23(22): 4738 4739.

[9] Khushbeer M, L isa F, W alter C M, et al. Interaction and effect of annealing temperature on primers used in differential display RT PCR[J] . Nucleic Acid Res, 1998, 26 (3): 854 856.

[10] Mou L, M iller H, L i J, et al. Improvements to the differential display method for gene analysis [J] . Biochem Biophys Res Commun, 1994, 199 (4): 564 569.

[11] Chapman M S, Q u N, Pascoe S, et al. Isolation of differentially expressed sequence tags from steroid responsive cells using mRNA differential display[J] . Mol Cell Endocrinol, 1995, 108 (1): 1 7.

[12] 王刚石, 王孟薇, 尤纬绵, 等. 荧光标记 mRNA 差异显示技术 [J] . 中国应用生理学杂志, 2000, 16 (4): 373 376.

[13] Peng Ling. Factors ensuring successful use of differential display[J] . Methods, 1998, 16: 361 364.

[14] Zhang H, Zhang R, Liang P. Differential screening of gene expression difference enriched by differential display [J] . Nucleic Acids Research, 1996, 24(12): 2454 2455.

[15] 刘红, 任笑蒙, 陈兰英. 一种快速筛选阳性克隆的方法—反向 Northern 印迹杂交技术[J] . 基础医学与临床, 2002, 22 (3): 278 280.

[16] 郑洁, 耿鑫. mRNA 差异显示技术及其在肿瘤研究中的应用 [J] . 国外医学肿瘤学分册, 2004, 31 (1): 30 33.

[17] 李群良, 刘启威, 蔡海波. 差异显示法分析不同生长环境中造血干 / 祖细胞基因表达的研究[J] . 中国生物工程杂志, 2006, 26 (1): 11 14.

[18] 程艳军, 郭士伟, 高东迎, 等. mRNA 差异显示技术在分离水稻基因中的应用 [J] . 中国农学通报, 2004, 20 (1): 29 31.

[19] 高风华, 谭学林. 水稻滇一型不育系及保持系花药 mRNA 差异显示[J] . 云南农业大学学报, 2006, 21(2): 150 153.

[20] 关荣发, 许梓荣. mRNA 差异显示技术在动物营养中的应用 [J] . 中国饲料, 2003, (5): 12 15.

《北方园艺》

《黑龙江农业科学》

《大豆科学》

欢迎订阅